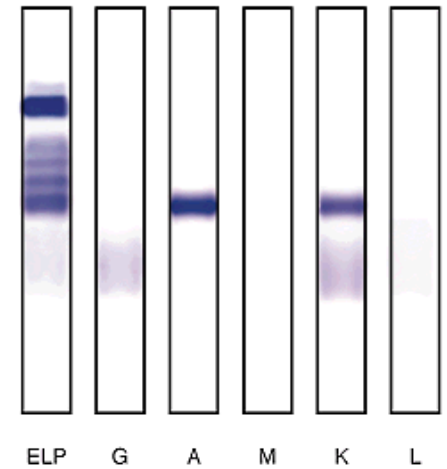


Imunofixace

- Metodou imunofixace lze identifikovat
PARAPROTEIN v séru, moči a likvoru



**paraprotein = monoklonální imunoglobulin
(monoklonální gamaglobulin)**

- je produkován 1 klonem B-lymfocytů
- může sestávat z těžkého řetězce IgG/A/M/D/E a lehkého řetězce kappa / lambda
- stav, kdy má pacient v séru paraprotein se nazývá **paraproteinémie** nebo **monoklonální gamapatie**

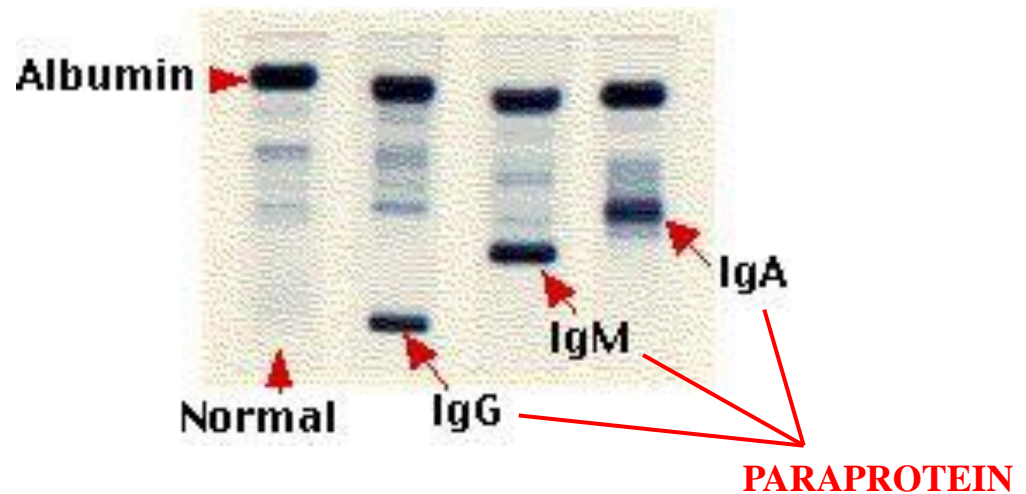
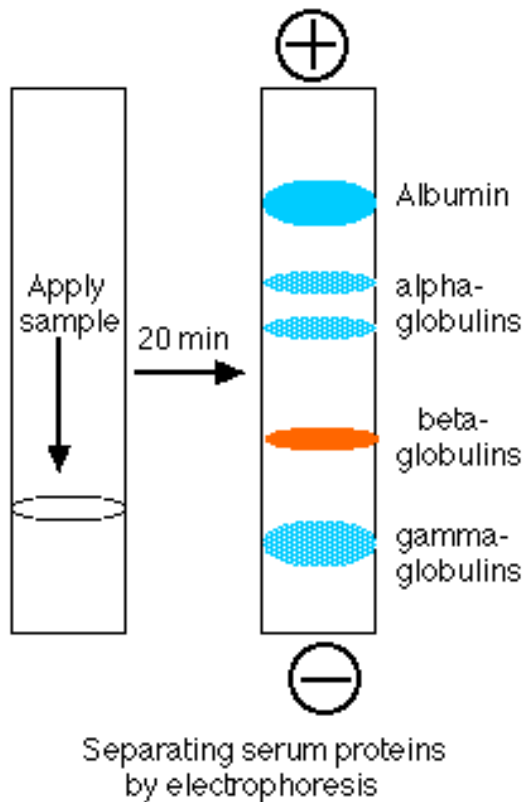
Imunofixace

- Paraprotein se vyskytuje např. u mnohočetného myelomu a jiných hematologických onemocnění
- 75 – 80% nemocných mnohočetným myelomem má v moči přítomny monoklonální lehké řetězce (Bence-Jonesova bílkovina). BJB poškozují buňky proximálních tubulů ledvin.
- U některých lidí je v séru přítomen paraprotein, aniž by měli příznaky onemocnění, u některých z nich se nemoc později rozvine

MGUS = monoklonální gamapatie neznámého významu
(monoclonal gammopathy of unknown significance)

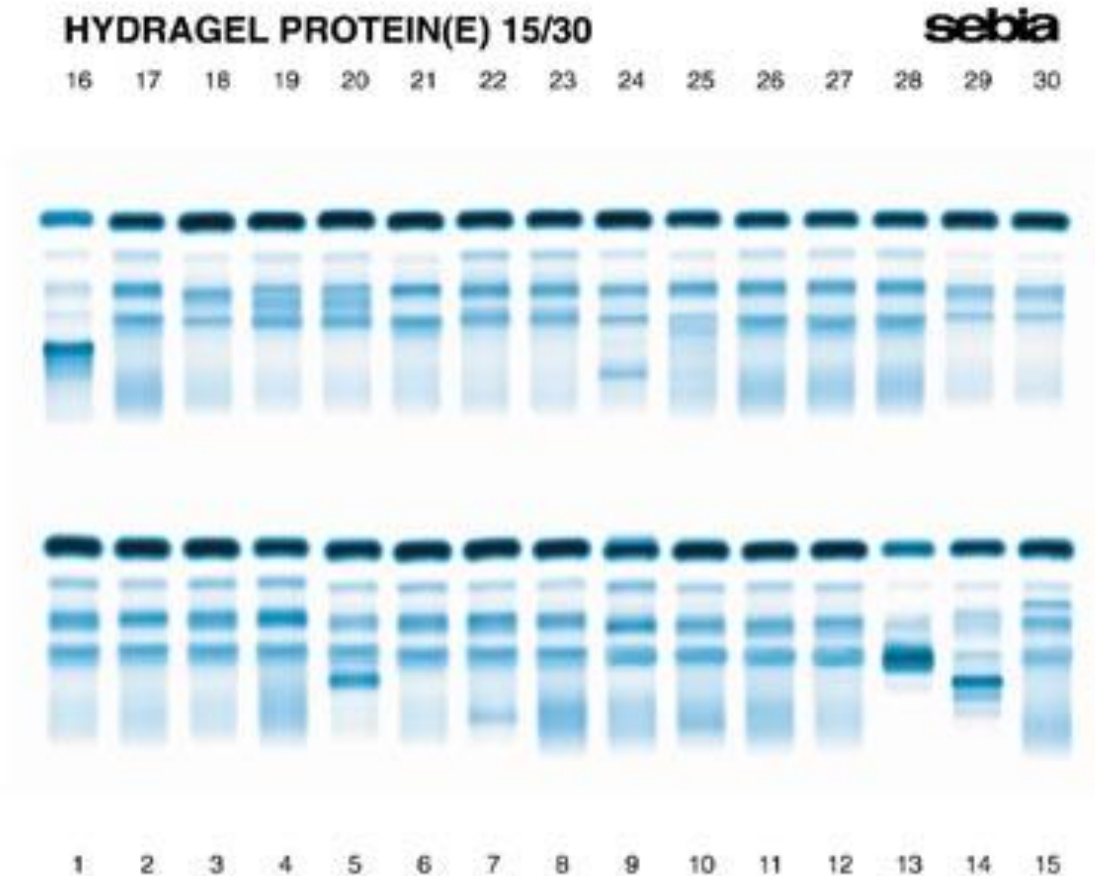
Elektroforéza sérových proteinů

- Rozdělí se na jednotlivé zóny podle elektroforetické pohyblivosti
- Může odhalit přítomnost paraproteinu, ale neurčí jeho typ



- lze zachytit pouze hrubé změny:
hyper- nebo hypogamaglobulinémie,
případně paraproteinémie

Elektroforéza sérových proteinů



Imunofixace

- dvoustupňová metoda
- první fáze: směs bílkovin se rozdělí podle ***elektroforetické pohyblivosti***
- druhá fáze: identifikace typu bílkoviny pomocí specifických protilátek - ***imunoprecipitace, barvení***
- Imunofixace je pouze kvalitativní metoda
- kvantitu paraproteinu lze určit z ELFO sérových proteinů podle intenzity zbarvení proužku

Imunofixace - postup

1. V gelu se zhotoví obvykle 6 startů, do nichž se aplikuje vzorek téhož pacienta
2. Po skončení elektroforézy se na povrch gelu přiloží šablona s vyříznutými okénky v místě elektroforetických drah
3. První dráha je klasická ELFO sérových proteinů, aplikuje se fixační roztok
4. Do ostatních drah se nanášejí specifické protilátky proti těžkým řetězcům IgG, IgA, IgM a proti lehkým řetězcům κ nebo λ

Imunofixace - postup

5. Protilátky difundují do gelu a v místě, kde reagují s příslušným antigenem vytvářejí imunokomplexy ve formě precipitátu
6. Promytím vhodným pufrem se odstraní jak antigeny nereagující s aplikovanou protilátkou, tak i nadbytek protilátky.
7. Po promytí v gelu zůstanou pouze nerozpuštěné imunokomplexy, vytvářející ohraničný pruh, který se zvýrazňuje obarvením.

Imunofixace

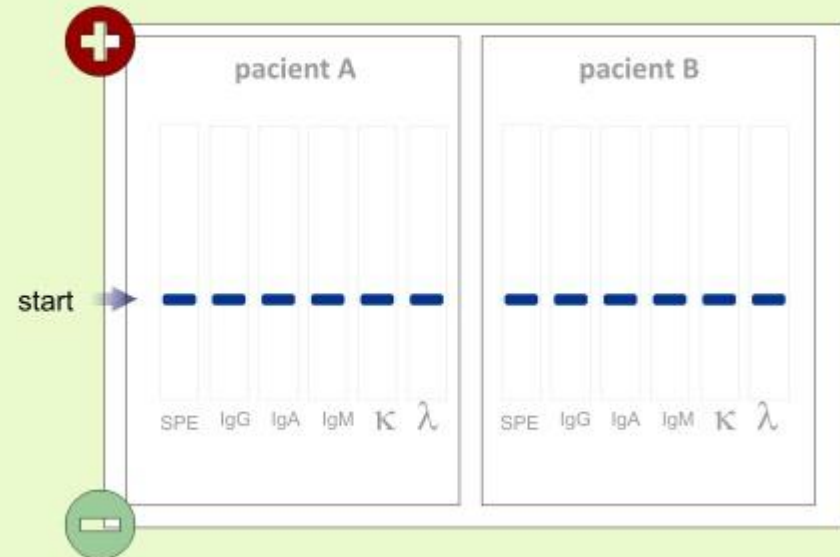
vzorky jsou aplikovány do 6ti specifických stop šablony

pacient A

pacient B



start elektroforetické migrace



Imunofixace

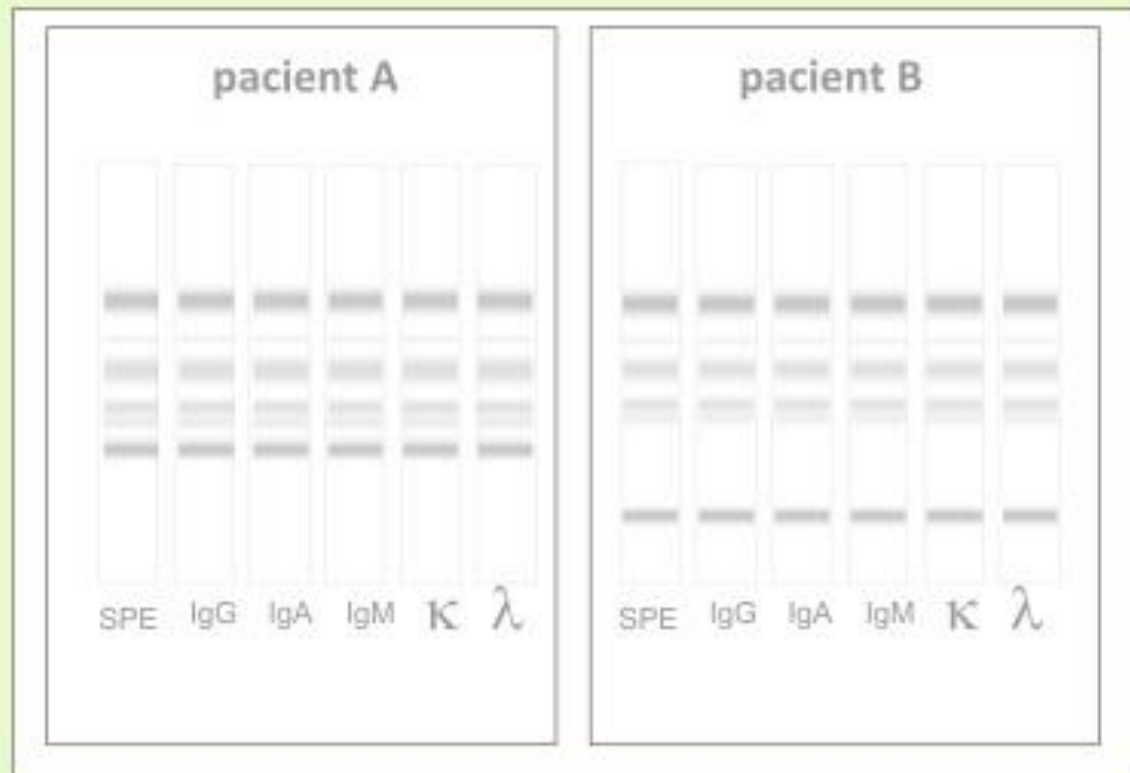
elektroforetická separace proteinů v alkalickém pH



2014/

Imunofixace

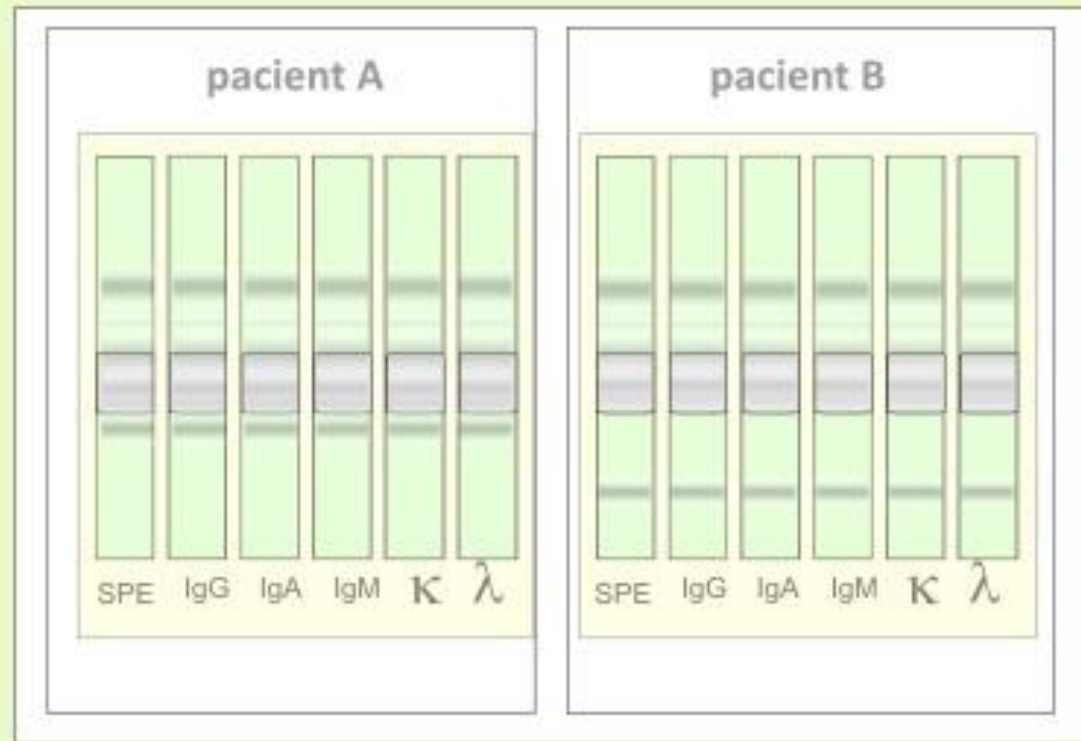
separované imunoglobulinové molekuly



2014/1

Imunofixace

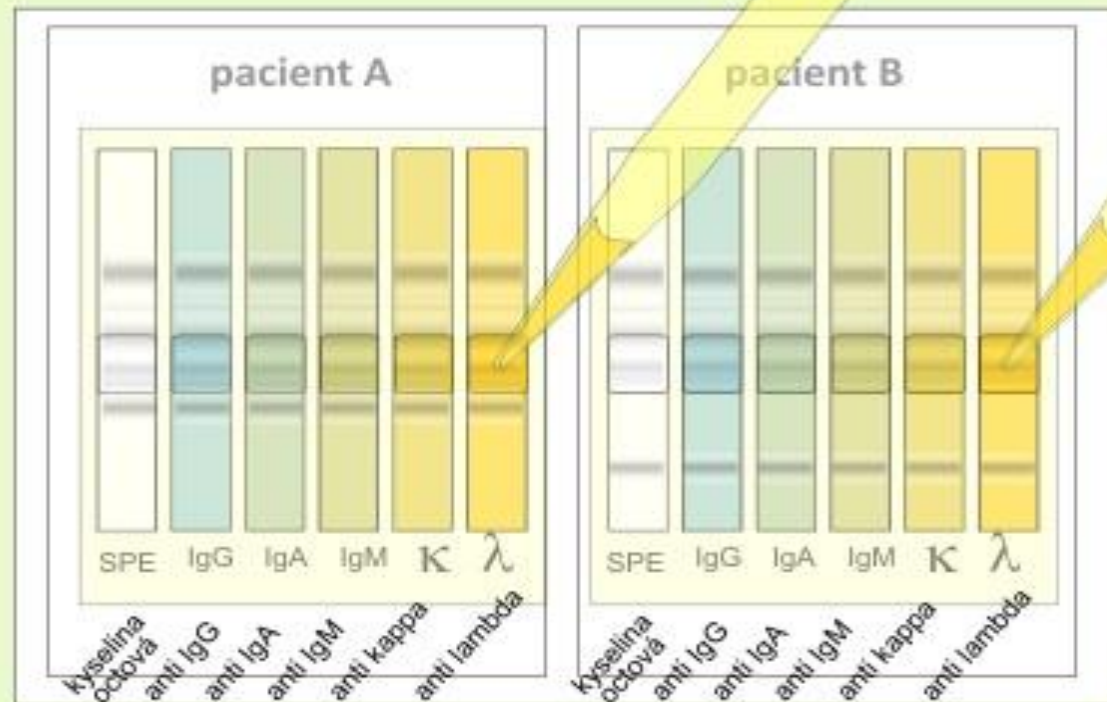
**přiložení magnetické masky
pro aplikaci roztoků antisér**



2014/1

Imunofixace

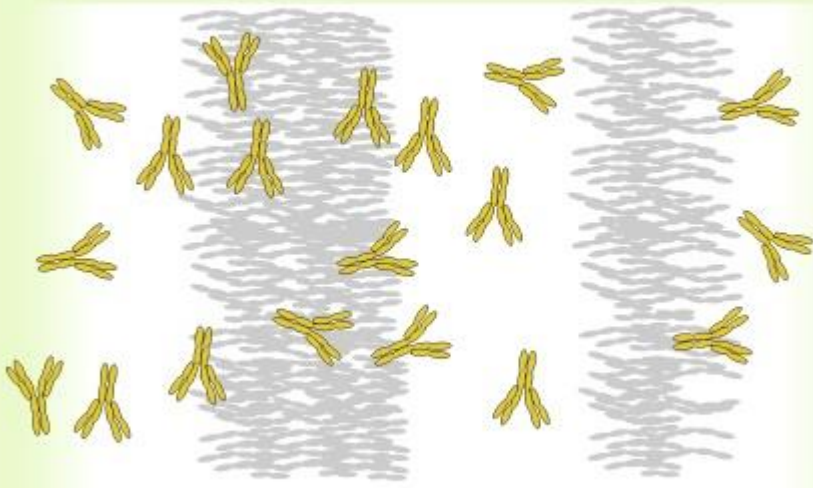
aplikace monospecifických antisér



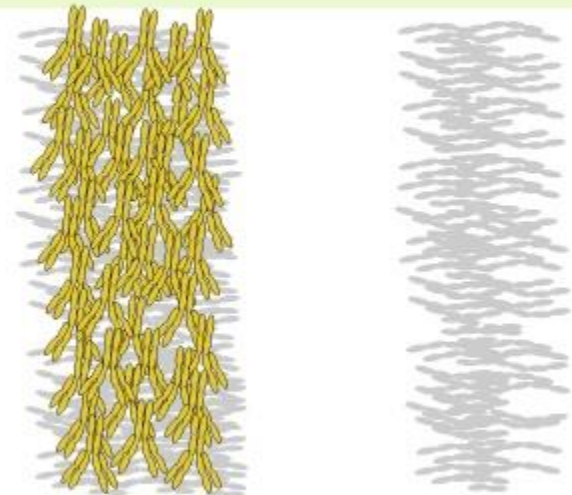
2010/

Imunofixace

monospecifická antiséra

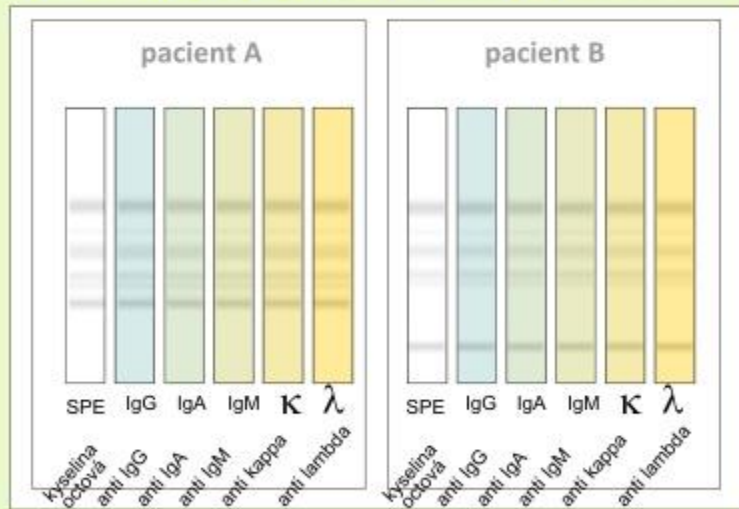


inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry

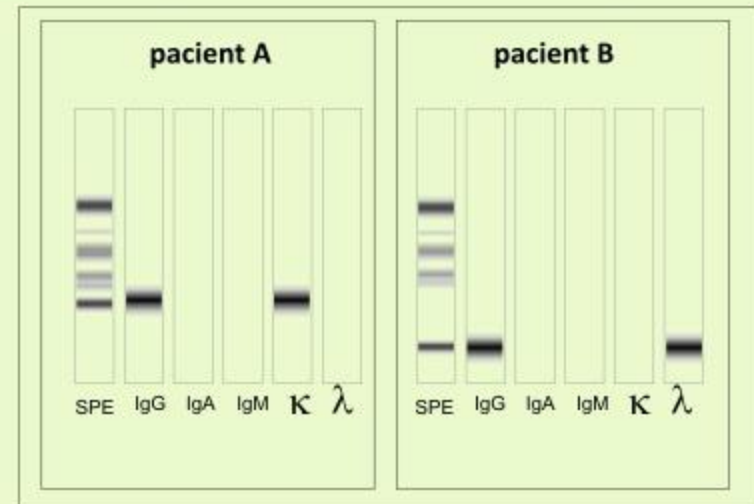


Imunofixace

inkubace,
imunoprecipitace s monospecifickými antiséry

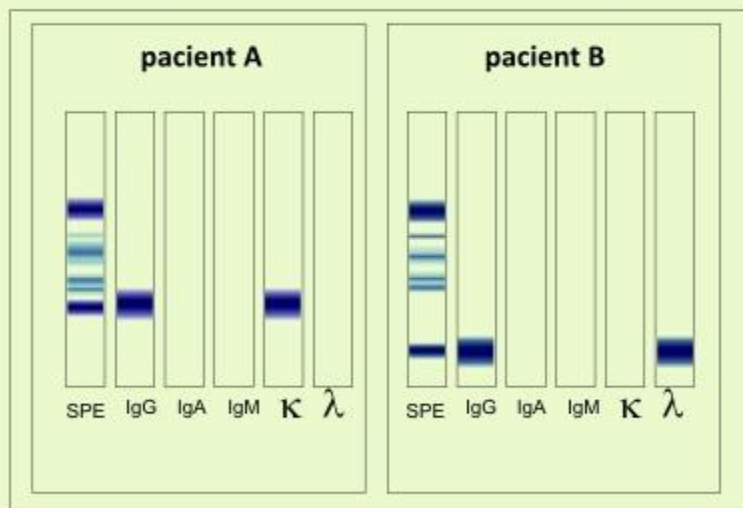


denaturace při 60°C

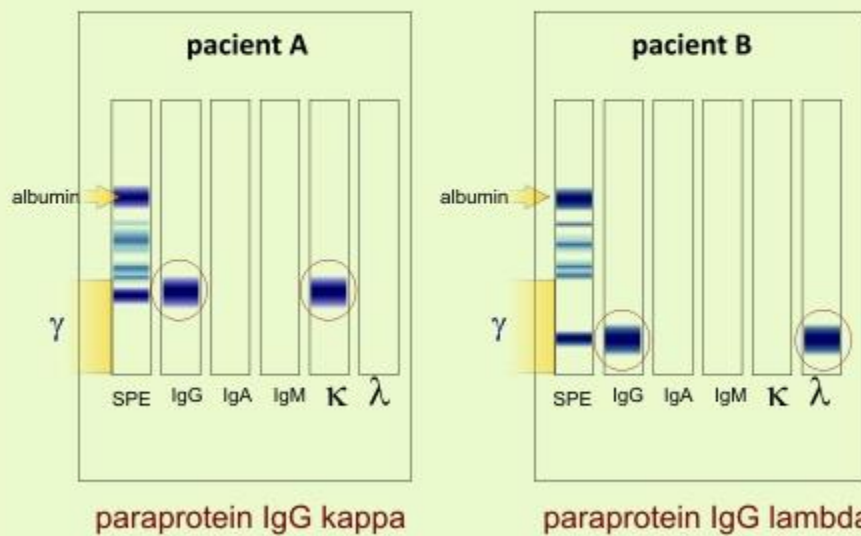


Imunofixace

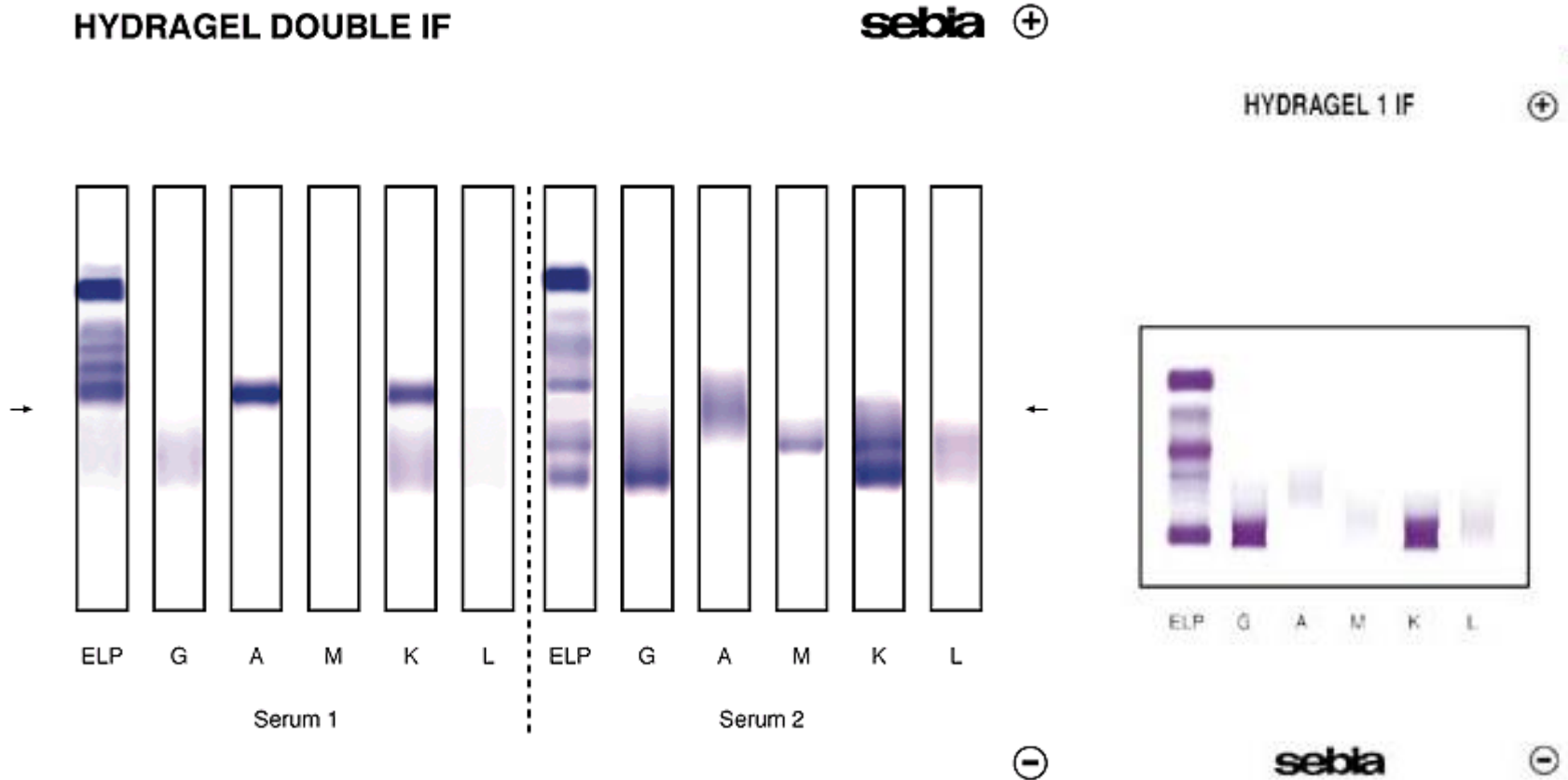
barvení



vyhodnocení



Imunofixace



Pozn. 75 – 80% nemocných mnohočetným myelomem má v moči přítomny monoklonální lehké řetězce (Bence-Jonesova bílkovina/paraprotein). BJB poškozují buňky proximálních tubulů ledvin.

MGUS monoklonální gamopatie nejasného původu